

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA, IMUNOLÓGICA E MOLECULAR DE PACIENTES
PORTADORES DE DOENÇA GRANULOMATOSA CRÔNICA ATENDIDOS NO
INSTITUTO DE MEDICINA INTEGRAL PROF. FERNANDO FIGUEIRA (IMIP)**

**CLINICAL, IMMUNOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERISTICS OF
CHRONIC GRANULOMATOUS DISEASE PATIENTS SEEN AT INSTITUTO DE
MEDICINA INTEGRAL PROF. FERNANDO FIGUEIRA (IMIP)**

João Henrique de Andrade Torres

Acadêmico do curso de medicina. Faculdade Pernambucana de Saúde. Recife, PE. Brasil.

Lívia Cardoso Pimentel

Acadêmica do curso de medicina. Faculdade Pernambucana de Saúde. Recife, PE. Brasil.

Paula Teixeira Lyra Marques

Médica assistente do Serviço de Imunologia Clínica do IMIP. Recife, PE. Brasil.

Edvaldo da Silva Souza

Médico assistente do Serviço de Imunologia Clínica do IMIP. Recife, PE. Brasil.

Ana Carla Augusto Moura Falcão

Médica assistente do Serviço de Imunologia Clínica do IMIP. Recife, PE. Brasil.

Leuridan Cavalcante Torres

Diretora de Pesquisa e do Laboratório de Pesquisa Translacional do IMIP. Recife, PE. Brasil.

João Bosco de Oliveira Filho

Pesquisador do Serviço de Imunologia Clínica do IMIP. Recife, PE. Brasil.

**Fonte de auxílio:
CNPq- Bolsa Jovem Talento**

RESUMO

Objetivos: Descrever aspectos clínicos e imunológicos de pacientes portadores de Doença Granulomatosa Crônica (DGC). **Método:** Revisão de prontuários de 9 pacientes portadores de DGC acompanhados no Serviço de Imunologia Clínica do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP), de março de 2013 a julho de 2015. Para a avaliação funcional de neutrófilos (produção de ânion superóxido) foi utilizado o teste da Dihidrorodamina 123 (DHR 123). Avaliação molecular foi realizada em 2 pacientes. A pesquisa seguiu as regras do Conselho Nacional de Saúde para pesquisas com seres humanos. **Resultados:** 6 pacientes do sexo masculino e 3 pacientes do sexo feminino. A idade média do diagnóstico foi de 5,8 anos. As infecções mais frequentes foram pneumonia (7), abscessos (3) e BCGíte (3). Colite foi observada em 4 pacientes. Os agentes etiológicos mais comuns *Staphylococcus aureus* (5), *Aspergillus* (3) e *Klebsiella* (2). Sequenciamento genético foi realizado em dois pacientes e detectada a mutação patogênica c.1162delG, p.D388fs no gene CYBB. **Conclusões:** Estes são os resultados preliminares da avaliação de um pequeno grupo de pacientes com DGC. Pneumonia, abscessos e BCGíte foram o sinal de alerta para o diagnóstico. Sequenciamento de DNA foi realizado em dois pacientes com mutações CYBB e em andamento para os demais pacientes.

Palavras-chave: pneumonia, abscessos, BCGíte, doença granulomatosa crônica, dihidrorodamina.

ABSTRACT

Objectives: Evaluate the clinical and immunological features of a group of pediatric patients with chronic granulomatous disease (CGD). **Methods:** Medical charts of 9 CGD patients were reviewed from march 2013 to june 2015 from IMIP Clinical Immunology Department. Neutrophil oxidative burst evaluated by flow cytometry using the dihydrorhodamine 123 (DHR) assay; and DNA sequencing (2 patients) for mutation analysis data, were done. The research followed all rules of National Health Council for researches with human beings. **Results:** 6 patients were male and 3 were female. The average age at diagnosis was 5,8 years. The most common infections were pneumonia (7), abscesses (3) and BCGite (3). Colitis was observed in 4 patients. The most common etiological agents were *Staphylococcus aureus* (5), *Aspergillus* (3) and *Klebsiella* (2). Genetic sequencing was performed in two patients and detected the pathogenic mutation c.1162delG, p.D388fs in CYBB gene. Bone marrow transplant was performed in two patients. All patients received antifungal prophylaxis and antimicrobial. **Conclusions:** These are preliminary results from the evaluation of group CGD patients. Pneumonia and abscesses were the warning sings for the diagnosis, besides the occurrence of BCGite. DNA sequencing was performed in two patients, which demonstrated CYBB mutations. Mutation analysis is ongoing for the remaining patients.

Key words: pneumonia, abscesses, BCGite, chronic granulomatous disease, dihydrorhodamine.

INTRODUÇÃO

A doença granulomatosa crônica (DGC) é uma imunodeficiência primária rara de fagócitos (neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos), causada por alterações genéticas que resultam num defeito no complexo enzimático nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase). O complexo NADPH oxidase é responsável pelo *burst* respiratório dos fagócitos e produção de superóxido, importantes na destruição de microorganismos fagocitados¹. A prevalência estimada da doença é de 1:200.000-1:250.000 nascidos vivos, conforme a população estudada^{2,3}.

As alterações genéticas determinantes da doença podem ser ligadas ao cromossomo X, por mutação no gene *CYBB*, que codifica a glicoproteína gp91^{phox} da NADPH oxidase; ou autossômicas recessivas, onde outros componentes do complexo enzimático são afetados, como p22^{phox} (mutações de gene *CYBA*), p47^{phox} (*NCF1*), p67^{phox} (*NCF2*) e p40^{phox} (*NCF4*). A forma mais comum de apresentação, em 70% dos casos, é ligada ao X, causada por mutações em *CYBB* (gp91^{phox}) e 20% dos casos são recessivos, por mutações em *NCF1* (p47^{phox})².

Caracteriza-se clinicamente por infecções bacterianas e/ou fúngicas recorrentes ou persistentes, desregulação de resposta inflamatória com formação de granulomas e outras desordens inflamatórias como a colite. As infecções envolvem tipicamente o pulmão (pneumonia), linfonodos (linfadenite), fígado (abscesso), ossos (osteomielite) e pele (abscessos ou celulites). Os granulomas são mais frequentes no trato gastrointestinal e genitourinário. A DGC ligada ao cromossomo X manifesta-se usualmente nos primeiros meses de vida, com infecções recorrentes e mais graves, com elevada morbimortalidade, quando comparada com a forma autossômica recessiva⁶.

Esta imunodeficiência primária deve ser suspeitada em todos os indivíduos com histórico de infecções precoces e recorrentes, causadas por microorganismos catalase-positivos,

particularmente, *Staphylococcus aureus*, *Nocardia species* e bactérias gram-negativas *Serratia marcescens*, *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia complex* e *Aspergillus species*. Os pacientes portadores de DGC apresentam também maior susceptibilidade a infecções por micobactérias, principalmente relacionadas à vacina BCG e tuberculose. Manifestações autoimunes são comuns, como púrpura trombocitopênica, (artrite idiopática juvenil) e doença pulmonar autoimune, entre outras^{7,8}.

O diagnóstico pode ser realizado através do teste de redução nitrobluetetrazolio (NBT) ou através da avaliação funcional de neutrófilos (produção de ânion superóxido) usando-se o teste de dihidrorodamina 123 (DHR 123)⁹. O teste de DHR avalia a capacidade de oxidação dos neutrófilos com e sem estímulo por *phorbol myristateacetate* (PMA), por citometria de fluxo. O teste de DHR é preferível por causa de sua capacidade de distinguir pacientes com forma da doença ligada ao X dos pacientes da forma autossômica recessiva *p47-phox*. Outras vantagens do DHR são a grande sensibilidade, facilidade de execução e baixo custo. O teste também pode detectar mães portadoras, nos casos ligados ao X, sem necessidade de testes genéticos¹⁰.

Nas últimas décadas, a profilaxia antimicrobiana para os pacientes portadores de DGC reduziu significativamente a incidência de infecções, com melhora da sobrevida. O antimicrobiano recomendado é a sulfametoxazol-trimetropim e o antifúngico, preferencialmente, o itraconazol¹¹. Em alguns centros, especialmente nos Estados Unidos, utiliza-se terapia imunomodulatória com interferongama subcutâneo (IFN γ). O transplante de medula óssea constitui, atualmente, o único tratamento curativo disponível para esse grupo de pacientes¹².

Nesse estudo foram revisadas as características clínicas, laboratoriais e genéticas dos pacientes com DGC acompanhados no IMIP.

MÉTODO

Realizou-se um estudo descritivo, através da revisão de prontuários de nove pacientes com diagnóstico de DGC atendidos no ambulatório de Imunologia do IMIP entre março de 2013 a julho de 2015. A coleta de dados foi realizada por meio de formulário específico com dados sobre idade dos pacientes, sexo, idade de início de sintomas, idade ao diagnóstico, histórico de infecções, número de admissões hospitalares, comorbidades, história familiar, medicações em uso e avaliação laboratorial – teste DHR e avaliação molecular, se disponível.

Foram coletados também dados referentes à evolução clínica dos pacientes após o diagnóstico e profilaxia antimicrobiana – histórico de infecções (número e agentes isolados), internações, manifestações autoimunes e transplante de medula óssea.

Os indivíduos incluídos no estudo foram crianças, adolescentes e adultos com diagnóstico de doença granulomatosa crônica (DGC) diagnosticados através do teste de DHR. O exame foi realizado no Laboratório de Pesquisa Translacional do IMIP no citômetro de fluxo FACSVERSE (BD Bioscience). Os pacientes acompanhados por suspeita de DGC que não realizaram o teste de DHR não foram incluídos no presente estudo.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do IMIP. Todos os pacientes e/ou responsáveis foram convidados a participar da pesquisa durante a visita ao ambulatório e foram informados dos objetivos da pesquisa. Todos os pacientes e/ou responsáveis concordaram em participar e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

RESULTADOS

Dentre os pacientes avaliados, 6 foram do sexo masculino (66,7%) e três do sexo feminino (33,3%) com idade média de diagnóstico de 5,8 anos (**Tabela 1**)

A infecção mais frequente foi pneumonia, em sete pacientes, seguida de abscessos- um abscesso hepático, um abscesso cervical e um abscesso perianal (**Tabela 1**). Três pacientes apresentaram reação localizada a vacinação BCG, três apresentaram infecção urinária e um teve uma otite média aguda (**Gráfico 1**). *Staphylococcus aureus* foi o agente etiológico mais prevalente, sendo isolado em cinco pacientes, seguido de *Aspergillus* em três pacientes e *Klebsiella* em dois pacientes (**Tabela 2**).

Apenas dois pacientes apresentavam história familiar positiva para infecções de repetição ou óbitos na primeira infância em indivíduos do sexo masculino. Um paciente, do sexo feminino, evoluiu com doenças autoimunes: tireoidite de Hashimoto e púrpura trombocitopênica imune.

Todos os pacientes iniciaram profilaxia antimicrobiana com sulfametoxazol-trimetoprim e antifúngica com itraconazol, após confirmação do diagnóstico. Alguns pacientes já recebiam tratamento profilático pela forte suspeita clínica e história familiar, como no caso de irmãos gêmeos, antes mesmo da realização do DHR.

O sequenciamento genético foi realizado em dois pacientes, que detectou mutação patogênica c.1162delG, p.D388fs no gene *CYBB* em ambos. Essa mutação leva a perda de uma base de DNA, com perda do frame de leitura do RNA mensageiro e consequente produção de uma proteína truncada, que se degrada precocemente.

O acompanhamento clínico após iniciado o tratamento profilático demonstrou que cinco pacientes necessitaram de pelo menos um internamento hospitalar. Um paciente foi a óbito no período do presente estudo. Dois pacientes realizaram transplante de medula óssea HLA não aparentado.

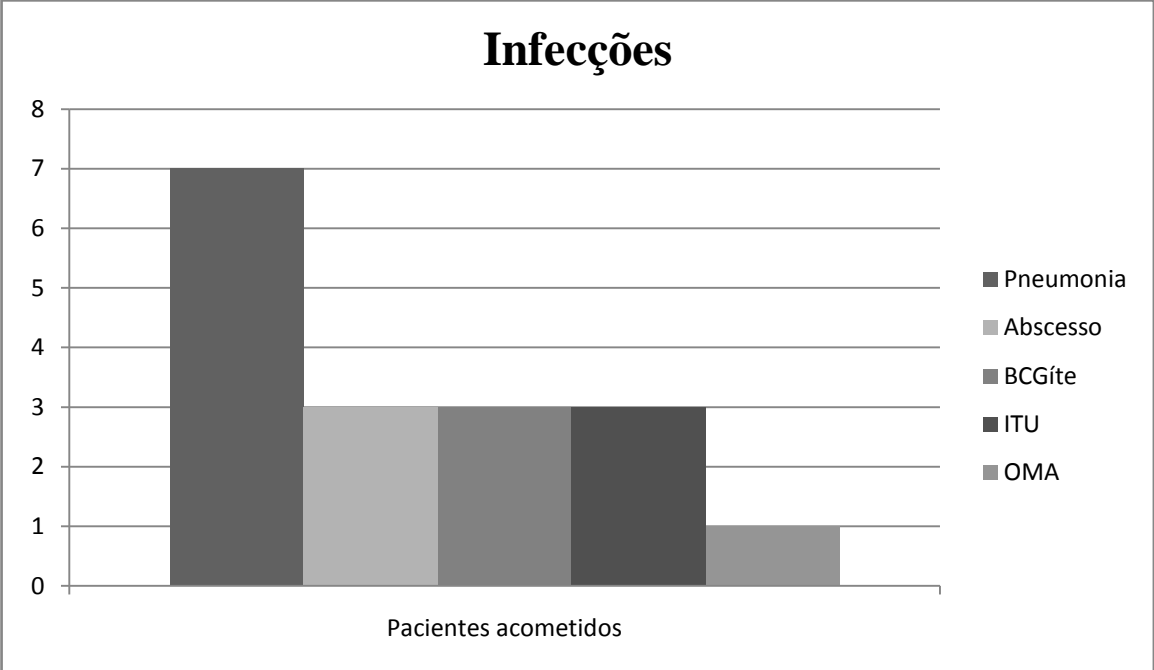
Tabela 1

Idade (anos) Sexo	Idade de início dos sintomas	Defeito Molecular	Idade do Diagnóstico	Histórico de Infecções	Abscesso	Profilaxia	Internações
5 Anos Masculino	2 anos 3 meses	—	2 anos 11 meses	Pneumonia	Perianal	Sulfametoxazol, Trimetoprim, Itraconazol	2
18 Anos Feminino	2 anos	---	16 anos 6 meses	Pneumonia, Furunculose, OMA	Hepático	Sulfametoxazol, Trimetoprim, Itraconazol	2
8 Anos Masculino	3 meses	---	6 anos	Adenite	Cervical	Sulfametoxazol, Trimetoprim, Itraconazol	2
3 Anos Masculino	< 1 mês	gp91 ^{phox}	11 meses	Pneumonia, BCGíte	---	Sulfametoxazol, Trimetoprim, Itraconazol	2
3 Anos Masculino	< 1 mês	gp91 ^{phox}	11 meses	Pneumonia, BCGíte, Candidíase	---	Sulfametoxazol, Trimetoprim, Itraconazol	2
3 Anos Masculino	3 meses	---	1 ano	Pneumonia, ITU	---	Sulfametoxazol, Trimetoprim, Itraconazol	2
2 Anos Feminino	1 mês	---	10 meses	Fasceite necrosante, ITU	---	Sulfametoxazol, Trimetoprim, Itraconazol	2
22 Anos Masculino	5 anos	---	22 anos	Pneumonia, Actinomicose, Adenite, Infecção por micobactéria BCGíte	---	Sulfametoxazol, Trimetoprim, Itraconazol	3
Feminino	9 meses	---	9 meses	Pneumonia, Sepse, ITU, Piodermites, Sinovite,	---	Sulfametoxazol, Trimetoprim, Itraconazol	1

Tabela 2 - Evolução pós-diagnóstico

Idade (anos) Sexo	Abscesso	Histórico de infecções	Culturas isoladas	Internações	Auto- imunidade	Transplante de medula óssea
5 Anos Masculino	----	IVAS, Proctocolite		0	---	
18 Anos Feminino	----	Pneumonia, encefalite, varicela disseminada	<i>Staphylococcus aureus</i>	2	Tireoidite de Hashimoto, PTI	
8 Anos Masculino	----	Bacteremia oculta Pneumonia fúngica	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Aspergillus</i>	2	---	
3 Anos Masculino	Perianal, peritoneal	Meningite fúngica com hidrocefalia hipertensiva, Pneumonia, Infecção por micobactéria, Diarreia	<i>Aspergillus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Sphingomonas paucimobilis</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Candida parapsilosis</i>	7	---	HLA não aparentado
3 Anos Masculino	----	Herpangina, Adenite inguinal, Estomatite recorrente, OMA, Infecção por micobactéria		2	---	HLA não aparentado
3 Anos Masculino	Furunculose	Lesões orais aftosas	<i>Staphylococcus aureus</i>	1	---	
2 Anos Feminino	----	Nódulos subcutâneos	<i>Staphylococcus hominis</i>	0	---	
22 Anos Masculino	----	----		0	---	
9 meses Feminino	----	Óbito	<i>Staphylococcus aureus</i>		---	

Gráfico 1



DISCUSSÃO

No presente estudo, a prevalência de doença granulomatosa crônica foi maior no sexo masculino, por ser a forma ligada ao X mais prevalente. A idade média do diagnóstico de 5,8 anos foi superior a 2,5 – 3 anos descrita em outras séries de casos, apesar do início dos sintomas ocorrerem, na maioria dos pacientes, antes do primeiro ano de vida. Isso sugere uma falta de reconhecimento clínico dessa entidade, levando a um atraso diagnóstico.

Pneumonia foi a infecção mais frequente, em 70% dos casos, semelhante ao descrito na literatura e ao registro da Sociedade Latinoamericana de Imunodeficiências (LASID). Destaca-se também a ocorrência de reação localizada relacionada a BCG em 30% dos pacientes, reforçando a suspeição diagnóstica para imunodeficiência primária em pacientes com BCGite localizada grave ou disseminada.

Dentre os agentes infecciosos, como esperado, *S.aureus* e *Aspergillus* foram os mais comumente isolados neste grupo de pacientes avaliados. Assim como em estudo realizado no Reino Unido e na Irlanda, pacientes em uso de tratamento profilático ainda apresentaram infecções graves bacterianas e fúngicas. No nosso estudo, seis pacientes (66%) necessitaram reinternação hospitalar, apesar da profilaxia antimicrobiana e antifúngica, sendo o principal agente etiológico isolado *Staphylococcus aureus*.

Interessantemente, 2 pacientes, irmãos gêmeos com mutação *CYBB*, evoluíram de forma distintas. O GI com infecções graves, invasivas e múltiplas internações e o GII, apenas, com manifestações orais – gengivite e estomatite. Ambos foram submetidos ao transplante de medula óssea HLA-não aparentado.

Dentre as manifestações inflamatórias, 44% dos pacientes avaliados evoluíram com colite e em um dos pacientes de difícil controle, com necessidade de uso de corticóide oral e mesalazina.

As manifestações autoimunes, comumente descritas na DGC, ocorreram apenas em um paciente, sexo feminino e com idade superior a 15 anos.

CONCLUSÃO

Estes são os resultados preliminares da avaliação de um pequeno grupo de pacientes com doença granulomatosa crônica. Destacam-se, como sinal de alerta para suspeita diagnóstica, as infecções (pneumonia e abscessos) de inícios precoces e recorrentes, predominantemente, no sexo masculino. A ocorrência de BCGíte localizada e colite, observadas em 30% e 40%, respectivamente, dos pacientes avaliados, também deve levar a suspeita dessa patologia. A identificação e diagnóstico precoces da DGC, com instituição da antibioticoprofilaxia e encaminhamento para transplante de medula óssea, melhora bastante o prognóstico dos pacientes.

REFERÊNCIAS

1. Curnutte JT. Chronic granulomatous disease: the solving of a clinical riddle at the molecular level. *Clin Immunol Immunopathol.* 1993;67(3 Pt 2):S2-15.
2. Winkelstein JA, Marino MC, Johnston RB Jr., Boyle J, Curnutte J, Gallin JI, et al. Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. *Medicine (Baltimore).* 2000;79(3):155-69.
3. Soler-Palacín P, Margareto C, Llobet P, Asensio O, Hernández M, Caragol I *et al.* Chronic granulomatous disease in pediatric patients: 25 years of experience. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2007;35:83-9.
4. Khanna G, Kao SC, Kirby P, Sato Y. Imaging of chronic granulomatous disease in children. *Radiographics* 2005;25:1183-95
5. Liese J, Kloos S, Jendrossek V, Petropoulou T, Wintergerst U, Notheis G *et al.* Long-term follow-up and outcome of 39 patients with chronic granulomatous disease. *J Pediatr* 2000;137:687-93.
6. Holland SM. Chronic granulomatous disease. *Clin Rev Allergy Immunol* 2010;38:3-10.
7. Holland SM. Chronic Granulomatous Disease. *Hematol Oncol Clin N Am.* 2013 Feb;27(1):89-99.
8. Marciano BE, Spalding C, Fitzgerald A, Holland SM. Common Severe Infections in Chronic Granulomatous Disease. *Clinical Infectious Diseases* 2015;60(8):1176–83.
9. Winkelstein JA, Marino MC, Johnston RB, Jr., et al. Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. *Medicine (Baltimore)* 2000;79:155-69.
10. Hafner J, Enderlin A, Seger RA, et al. Discoid lupus erythematosus-like lesions in carriers of X-linked chronic granulomatous disease. *Br J Dermatol* 1992;127:446-7.

11. Margolis DM, Melnick DA, Alling DW, Gallin JI. Trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis in the management of chronic granulomatous disease. *The Journal of infectious diseases* 1990;162:723-6.
12. Kang EM, Marciano BE, DeRavin S, Zarembek KA, Holland SM, Malech HL. Chronic granulomatous disease: Overview and hematopoietic stem cell transplantation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2011;127:1319-25.
13. Falcone EL, Holland SM. Invasive fungal infection in chronic granulomatous disease: insights into pathogenesis and management. *Curr Opin Infect Dis* 2012;25:658–69.
14. Oliveira EB, Zurro NB, Prando C. Clinical and Genotypic Spectrum of Chronic Granulomatous Disease in 71 Latin American Patients: First Report From the LASID Registry. *Pediatr Blood Cancer*. 2015 Jul 15.
15. Bortoletto P1, Lyman K, Camacho A, Fricchione M, Khanolkar A, Katz BZ. Chronic Granulomatous Disease: A Large, Single-Center U.S. Experience. *Pediatr Infect Dis J*. 2015 Jul 15.
16. L. B. K. R. Jones, P. McGrogan, T. J. Flood, A. R. Gennery, L. Morton, A. Thrasher, D. Goldblatt, L. Parker, A. J. Cant. Chronic granulomatous disease in the United Kingdom and Ireland: a comprehensive national patient-based registry. *British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology*, 152: 211–218